

Aus dem Pathologisch-anatomischen Institut
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. Volker Becker

Liquorgängigkeit von
6-Amidino-2-(4-amidinophenyl) indol bei
Katzen nach intravenöser Applikation

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Thomas E.K. Hohenstatt
aus Stuttgart

Aus dem Pathologisch-anatomischen Institut
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. Volker Becker

Liquorgängigkeit von
6-Amidino-2-(4-amidinophenyl) indol bei
Katzen nach intravenöser Applikation

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Thomas E. K. Hohenstatt
aus Stuttgart

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. V. Becker

Referent: Prof. Dr. H. Schmidt

Korreferent: Prof. Dr. V. Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 24.01.1983

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von 1977 bis 1980 am Institut für Pharmakologie und Lebensmittelchemie der Universität Erlangen-Nürnberg durchgeführt.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhalt

1.	Einleitung	1
2.	Material	4
2.1	Versuchstier	4
2.2	Versuchssubstanzen	5
3.	Methode	6
3.1	Übersicht	6
3.2	Versuchsablauf	7
3.3	Arbeitsschritte	9
3.4	Aufarbeitungsschema	10
3.5	Arbeitsmaterialien u. Geräte	11
3.6	Technische Daten u. Grenzwerte	13
3.7	Berechnung der Ergebnisse	16
3.8	Präzision und Richtigkeit	19
4.	Tierversuch	21
4.1	Applikation der Versuchssubstanz	21
4.2	Probengewinnung	22
4.3	Entnahmezeiten der verschiedenen Probematerialien	24

5.	Ergebnisse	25
5.1	Liquorspiegel	25
5.2	Serumspiegel	25
5.3	Konzentration im Gehirn	26
5.4	Konzentration in Leber, Niere und Herzmuskel	27
5.5	Fruchtwasserspiegel	27
6.	Diskussion	28
	Zusammenfassung	36
	Literaturverzeichnis	38

1. E i n l e i t u n g

Die afrikanische Schlafkrankheit (Trypanosomiasis) wird von einzelligen zu den Flagellaten zu rechnenden Protozoen der Gattung Trypanosoma hervorgerufen. Die Übertragung auf den Menschen und Warmblüter erfolgt hauptsächlich durch blutsaugende Fliegen der Gattung Glossina aus der Familie der Tse-Tse-Fliegen (NAUCK, 1975).

Bis heute sind zahlreiche Trypanosomenstämme isoliert worden, die sich vor allem hinsichtlich ihrer Spezifität, Virulenz und Pathogenität unterscheiden. Die menschenpathogenen Trypanosomen *T. rhodesiense* und *T. gambiense* parasitieren in Blut, Lymphspalten und Gewebsspalten der parenchymatösen Organe (LOSOS u. IKEDE, 1972), während die Vertreter der rinderpathogenen Trypanosomen *T. congolense* und *T. vivax* auf die periphere Blutbahn beschränkt zu sein scheinen.

Seither konnte kein Medikament entwickelt werden, das gegen alle Trypanosomenstämme gleichermaßen in jedem Stadium der Krankheit wirkungsvoll einsetzbar ist.

Die Behandlung der menschlichen Schlafkrankheit stützt sich in der Frühphase der Erkrankung noch immer auf das in den zwanziger Jahren dieses Jahrhunderts entwickelte

Germanin (R) und das in den vierziger Jahren entwickelte Pentamidin (R) (KNÜTTGEN, 1975). In neuerer Zeit wird außerdem das zur Behandlung von Rindertrypanosomiasen entwickelte Diamidin Berenil (R) zur Behandlung der menschlichen Trypanosomeninfektion herangezogen. Diese Präparate werden mit gutem Erfolg im ersten Stadium der Krankheit eingesetzt, versagen jedoch im zweiten Krankheitsstadium, weil sie die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren (KNÜTTGEN, 1975).

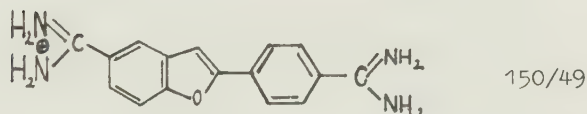
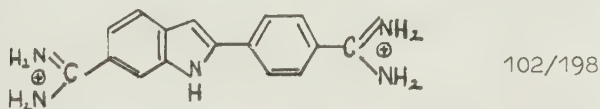
Im zweiten Krankheitsstadium stehen momentan nur die Arsenikalien Tryparsamid (R) und Melarsoprol (R) zur Verfügung, die jedoch wegen ihrer Toxizität nur bedingt einsetzbar sind.

Im Jahre 1970 wurde von der Arbeitsgruppe O.DANN, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Erlangen-Nürnberg, ein Präparat, das trypanocide, fluoreszierende Diamidin DAPI = 102/198, 6-Amidino-2-(4-amidinophenyl)indol synthetisiert, das bei Versuchen an infizierten Labortieren insbesondere gegen *T. rhodesiense* und *T. congolense* eine spezifische Wirkung zeigte (DANN u. FINK, 1974).

In Versuchen an infizierten Affen (*macaca mulatta*) mit einem strukturähnlichen Präparat der gleichen Arbeitsgruppe (98/202), konnte eine spezifische Wirkung auch im zweiten Stadium der Erkrankung erzielt werden (RAETHER u. SEIDENATH, 1976).

Formelübersicht:

Strukturformeln der Diamidine 6-Amidino-
2-(4-amidinophenyl)indol (=102/198) und
5- Amidino-2-(4-amidinophenyl) benzofuran
(=150/49)



Daher liegt die Vermutung nahe, daß es unter den Diamidinen Vertreter gibt, die auch im Spätstadium der Trypanosomiasen in der Lage sind, eine ausreichende therapeutische Wirkung zu zeigen. Die Voraussetzung dafür muß sein, daß solche Präparate liquorgängig sind.

Daher wurde in dieser Arbeit, im Hinblick auf die Frage nach der Wirksamkeit von Diamidinen in der zweiten Phase der menschlichen Schlafkrankheit, die Liquorgängigkeit des fluoreszierenden Diamidins 102/198 nach intravenöser Applikation bei Katzen untersucht.

2. M a t e r i a l

2.1. Versuchstier

Die Versuche zur Liquorgängigkeit des Diamidins 102/198 wurden an Katzen angestellt. Da das Versuchstier Maus nicht über ausreichende Liquorvolumina verfügt, mußte auf ein größeres Versuchstier ausgewichen werden. In der Neurochirurgischen Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg unter Leitung von Prof. Dr. Kunze verfügte die Versuchstierabteilung über operative Erfahrung mit Katzen, weswegen die Entscheidung zugunsten dieses Versuchstiers ausfiel. Das in dieser Arbeit benutzte chemisch-analytische Verfahren zur Bestimmung des Diamidingehalts von organischem Material (KALIWODA, 1976) läßt sich in vollem Umfang auf den gewonnenen Liquor cerebrospinalis (L.c.) und alle anderen zu untersuchenden Proben bei der Katze anwenden. Die Tiere waren zwischen einem und zwei Jahren alt, wogen zwischen 1,5 u. 2,5 kg und wurden von einem Labortierstall bezogen. Während der Zeit der Experimente erfolgte die Tierhaltung in einem Raum, in dem sich die Tiere frei bewegen konnten. Die Ernährung bestand aus handelsüblichem Trockenfutter und Vollmilch.

Aus der Gruppe der fluoreszierenden Diamidine der Arbeitsgruppe O. DANN wurden Chargen von 102/198, 6-Amidino-2-(4-amidinophenyl)indol, kurz "Dapi", und 150/49, 5-Amidino-2-(4-amidinophenyl)benzofuran verwendet (O. DANN, 1970-75). Beide sind gut wasserlöslich und können dünnschichtchromatographisch als rein betrachtet werden.

In den Tierversuchen wurde jeweils mit einer Dosis von 10 mg/kg aktiver Base der Substanz 102/198 gearbeitet, um die Ergebnisse untereinander und mit Literaturangaben vergleichen zu können. Zur Herstellung der Lösungen wurde Aqua bidest. benutzt.

Die Substanz 150/49 diente in den Versuchen ausschließlich als innerer Standard im chemisch-analytischen Verfahren, und wurde erst nach der Proben-gewinnung dem biologischen Material in wässriger Lösung zugesetzt.

Der Basenanteil der Diamidine betrug im Falle des verwendeten Dilaktats von 102/198 60,6% im Falle des Dihydrochlorids von 150/49 79,2%.

Alle in dieser Arbeit genannten Dosisangaben für diese beiden Substanzen beziehen sich auf den Basen-anteil des jeweils benutzten Salzes von 102/198 und 150/49.

3. M e t h o d e

3.1 Übersicht

Die Extraktion aus biologischem Material, die Verwendung eines inneren Standards, das Anreicherungsverfahren, das dünnschichtchromatographische Verfahren sowie die Messung der fluoreszierenden Diamidine mit Hilfe der in-situ-Fluorimetrie wurden nach einer von Kaliwoda entwickelten Methode durchgeführt (KALIWODA, 1976). Diese bot sich vor allem an, weil Kaliwoda mit den gleichen Versuchssubstanzen arbeitete und der Versuchsaufbau mit allen dazu notwendigen Geräten am Institut für Pharmakologie und Lebensmittelchemie der Universität Erlangen-Nürnberg zur Verfügung standen.

In eigenen Vorversuchen mit biologischem Material der Katze konnte gezeigt werden, daß die Methode in vollem Umfang hinsichtlich Reproduzierbarkeit, Wiederfindungsraten und Nachweisgrenzen für diese Arbeit anwendbar ist.

3.2 Versuchsablauf

Zur Beantwortung der Frage nach der Liquorgängigkeit der Substanz nach intravenöser Applikation standen fünf Katzen zur Verfügung, denen zu unterschiedlichen Zeiten Liquor cerebrospinalis abpunktiert wurde. Jedem Tier konnte nur einmal Liquor cerebrospinalis in ausreichender Menge entnommen werden.

Jeweils nach der Abnahme wurde die Probe mit innerem Standard 150/49 versetzt und bei 20° C unter Lichtausschluß drei Stunden inkubiert.

Wegen der zu erwartenden niedrigen Substanzkonzentrationen in den Proben mußte auf ein direktes Aufbringen auf die Dünnschichtplatten verzichtet werden. Mit Hilfe eines Anreicherungsverfahrens konnte die Nachweisgrenze der Substanz 102/198 um eine Zehnerpotenz verbessert werden.

Die Aufarbeitung der Analysenproben erfolgte gemäß dem unter 3.4 beschriebenen Aufarbeitungsschema, an dessen Ende das Diamidin in salzsaurer Lösung vorlag. Mit 10 µl Eppendorfpipetten wurden von dieser Lösung je drei Ansätze auf die Startlinie einer Dünnschichtplatte pipettiert, so daß von jeder Probe mehrere voneinander unabhängige Bestimmungen durchgeführt werden konnten.

Auf dieselbe Platte wurden jeweils drei standardisierte Vergleichslösungen der Substanzen 102/198 und 150/49 aufgetragen, deren Konzentrationen innerhalb des linearen Meßbereiches lagen. Diese wurden zusammen mit den Analysenspots unter denselben Bedingungen chromatographiert, entwickelt und gemessen. Die Messung erfolgte mit einem Zeiss-Chromatogramm-Spektralphotometer mit angeschlossenem Kompensationslinienschreiber. Die damit erhaltenen Fluoreszenzintensitätsortskurven wurden planimetriert und miteinander ins Verhältnis gesetzt. Die Ergebnisse wurden über mehrere Korrekturfaktoren berechnet.

Frisch entnommene Blutproben wurden sofort bei 3000 U/m zentrifugiert, das Serum mit Eppendorfpipetten abgetrennt. Das weitere Verfahren unterscheidet sich nicht von der Aufarbeitung der Liquorproben.

Organproben wurden nach ihrer Entnahme mit Fließpapier getrocknet, gewogen und sodann in kleine Stücke geschnitten und maschinell homogenisiert. Danach erfolgte die Zugabe des inneren Standards 150/49 und die weitere Aufarbeitung gemäß 3.4.

3.3 Arbeitsschritte

Die Methode umfaßt folgende Arbeitsschritte:

- 1.) Entnahme und Vorbereitung der zu untersuchenden Probematerialien
- 2.) Zugabe von innerem Standard 150/49 in wässriger Lösung ⁺
- 3.) Extraktion der Substanz 102/198 aus dem biologischem Material ⁺
- 4.) Anreicherungsverfahren ⁺
- 5.) Abtrennung von störenden Begleitstoffen durch Dünnschichtchromatographie und dünnschichtchromatographische Trennung von 102/198 und innerem Standard 150/49 ⁺
- 6.) Messung mit Hilfe der in-situ-Fluorometrie
- 7.) Korrektur und Auswertung der Meßergebnisse

⁺) anwendbar bei zu erwartender Substanzkonzentration von weniger als 1 µg/ml bei flüssigen Proben, außerdem bei allen Organproben unabhängig von der Substanzkonzentration.

3.4 Aufarbeitungsschema

Aufarbeitungsschema für Liquor cerebrospinalis (L.c.)

Serum, Fruchtwasser und Organe.

	Serum, L.c. Fruchtwasser	Organe	
Probenmaterial (ml bzw. g)	1,0	2,0- 4,0	Proben- vorberei- tung und Zugabe innerer Standard A
Natriumchloridlösg. 0,9% (ml)	1,0	20,0- 40,0	
Innerer Standard -Lösung(ml)	0,02- 0,05 +)	0,05- 0,1 +)	
Drei Stunden bei Zimmertemperatur stehen lassen In das gleiche Gefäß zugeben:			
		Homoge- nisieren	
Guanidin HCL (g)	0,1	1,0- 2,0	Extraktion B
n-Oktanol (ml)	1,0	10,0- 20,0	
2N Natronlauge (ml)	0,5	5,0- 10,0	
15 Minuten kräftig rotieren, Überstand 10 Minuten bei 5000 U/min zentrifugieren, dann in Mikrolitergefäße pipettieren:			
0,1 N Salzsäure (ml)	0,05		Anreiche- rung C
von obiger Oktanol- phase (ml)	0,05-0,5 ++)		
n-Heptan (ml)	0,1		
15 Minuten rotieren, dann 10 Minuten bei 5000 U/min zentrifugieren. Entfernen der Oktanol-Heptan-Phase, pH-Kontrolle der Wasserphase (muß sauer sein). Entnahme von 10 µl der sauren Lösung zur DC			

+) in der gleichen Größenordnung wie der zu erwartende
Gehalt der Probe an Substanz 102/198;

++) abhängig von der Diamidinkonzentration, bei Bedarf
wird mit Leeroktanol auf 0,5ml ergänzt;

3.5 Arbeitsmaterialien und Geräte

Die für die Arbeit notwendigen Materialien und Geräte standen zum großen Teil im Institut für Pharmakologie und Lebensmittelchemie der Universität Erlangen-Nürnberg noch aus der Zeit bereit, als die Methode entwickelt wurde (KALIWODA, 1976).

Im einzelnen bedürfen die hier aufgeführten Details der besonderen Erwähnung:

- Für die Dünnschichtchromatographie:
 - . Kieselgel 60 HR, reinst nach Stahl, E. MERCK, Darmstadt.
 - . Glasplatten 200 x 200 mm, 1,3 mm dick.
 - . UNOPLAN-Streichgerät für Dünnschichtplatten SHANDON, London
 - . Eppendorfpipetten mit Polypropylen-Spitzen EPPENDORF, Hamburg.
 - . Polypropylengefäße, SARSTEDT, Nümbrecht-Rommelsdorf.
 - . DC-Entwicklungskammer Nr 120160, DESEGA, Heidelberg
- Messplatzausrüstung:
 - . Chromatogramm-Spektralphotometer PMQ II mit Chromatogramm-Ansatz, ZEISS, Oberkochen.
 - . SERVOGOR, Typ 511, Kompensationslinienschreiber METRAWATT AG, Nürnberg
 - . OTT-Planimeter Nr 19 "ELPHOR", Dr. Bender und Dr. Hobein, München.

- Laborgerätschaften:

- . Homogenisator, Typ ho, BÜHLER, Tübingen
- . Ultraschallbad SONOREX, Typ RK 82, 40 kHz, BANDELIN - ELECTRONIC KG, Berlin
- . Vakuumtrockenschrank, Typ RVT, HERAEUS GmbH, Hanau
- . MEDVAK-Pumpe, Typ MP1, PFEIFFER, Wetzlar
- . Laborzentrifuge PICCOLO, HERAEUS CHRIST Osterode
- . Rotationsschüttelmaschine, Eigenfertigung KALIWCDA

- Reagentien:

- . Guanidiniumchlorid für biochem. Zwecke, MERCK
- . n-Oktanol rein, MERCK
- . n-Heptan zur Synthese, MERCK
- . n-Butanol, MERCK

Die Lösungsmittel zur Fluorimetrie waren auf Eigenfluoreszenz geprüft.

- Tierversuch: Pentobarbital (Nembutal (R))
- . Rekord-Einmalspritzen und Rekord-Einmalkanülen

3.6 Technische Daten und Grenzwerte

a) Zur Dünnschichtchromatographie

Es wurden selbstbeschichtete Dünnschichtplatten benutzt: 200 mm x 200 mm , 1,25 mm stark.

Adsorbens: Kieselgel HR 60 "MERCK", ohne Bindemittel.

Schichtdicke 0,2 mm mit Unoplan-Streichgerät.

Beladbarkeit der Schicht 150 ng bei einem Fleckdurchmesser von 10 mm .

Nachweisgrenze der Methode: 1ng der Substanzen 102/198 und 150/49 konnten reproduzierbar bestimmt werden.

Fließmittel für die Entwicklung: n-Butanol - 2N HCl, Laufzeit ca 10 Stunden.

Abdampfen des Fließmittels im Vakuumtrockenschrank bei 20 Torr und 50° C, danach N₂ - Beschickung des Ofens bis zur Messung.

Direktes Auftragen von Serum, L.c. und Fruchtwasser ist bei Konzentrationen von 1 µl/ml und darüber möglich. Die Wiederfindungsrate beträgt dabei zwischen 91 und 100% .

Innerer Standard: Substanz 150/49, fluoreszierend, strukturähnlich zur Substanz 102/198, deutliche Trennung bei der Dünnschichtchromatographie.

b) Meßplatzbeschreibung

Die Messung der entwickelten Dünnschichtplatten erfolgte mit dem Zeiss-Chromatogramm-Spektralphotometer PM Q II mit angeschlossenem Kompensationslinienschreiber Servogor, Typ 511.

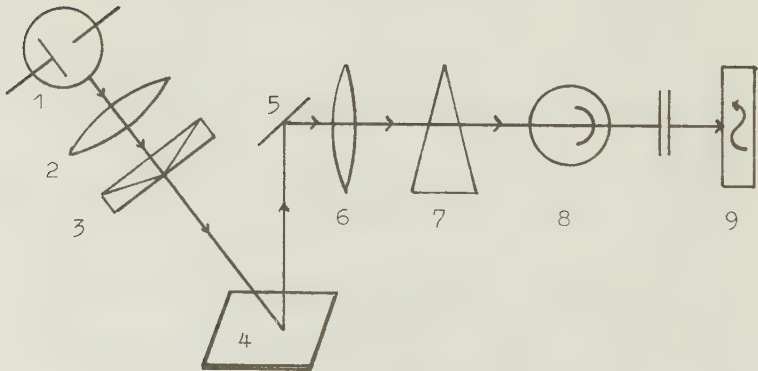


Abb.: Schematische Versuchsanordnung für die
Fluorimetrie, Chromatogramm-Spektralphoto-
meter PM Q II

- 1 = Hg - Mitteldruckbrenner
- 2 + 6 = Zwischenoptik
- 3 = Monochromatorfilter
- 4 = Kreutztisch mit DC-Platte (motorbetrieben)
- 5 = Umlenkspiegel
- 7 = Monochromator
- 8 = Empfänger
- 9 = Schreiber

Auf dem Kreutztisch wird die Dünnschichtplatte mit den Substanzflecken unter der Spaltlampe vorbeigefahren. Man erhält so Fluoreszenzintensitätskurven, deren Fläche über der Basislinie ein Maß für die vorliegende Substanzmenge darstellt.

Anregung: Mit einem Quecksilberbrenner St 41

Anregungswellenlängen (λ_A): für 102/198 365nm
für 150/49 313nm

Emissionswellenlänge (λ_E): für 102/198 450,5nm
für 150/49 408,2nm

Monochromatorspalt: 1 - 2 mm

zur Erfassung geringster Substanz-
mengen 2 mm Öffnung

Schreiberempfindlichkeit und Verstärkung am Anzeigerät wurden so niedrig gewählt, daß das Grundrauschen der Geräte und der Platten eben unterdrückt wurde.

Papiervorschubgeschwindigkeit: 120 mm/min

Tischvorschub: Stufe 2,5

Linearer Meßbereich, (BRAUNSBURG und OSBORN, 1952)
und (SEILER und MÖLLER, 1969):

$$I_F = K \cdot I_O \cdot c$$

I_F = Fluoreszenzintensität

K = steht für konstante Meßbedingungen

I_O = Intensität des Erregerlichtes

c = molare Konzentration der fluoreszierenden Substanz

Linearität der Beziehung von Fluoreszenzintensität und der Konzentration der fluoreszierenden Substanz ist gegeben für:

102/198	1ng bis 150ng bei $\lambda_A = 365 \text{ nm}$
150/49	1ng bis 150ng bei $\lambda_A = 313 \text{ nm}$

3.7 Berechnung der Ergebnisse

Die Berechnung der Ergebnisse stützt sich auf folgende Parameter:

- 1.) WR_{IS} = gefundene Wiederfindungsrate des inneren Standards
- 2.) Q = Quotient der Wiederfindungsraten von 150/49 und 102/198
- 3.) K = Konzentration der Probe pro Fleck (ng/10 μ l)
- 4.) O_v = Oktanolvolumen, das von der Oktanolphase in 3.4 entnommen wurde.

Die Peakflächen der Proben und der Vergleichslösungen von 102/198 und 150/49 einer Platte wurden größenordnungsmäßig zueinander in Beziehung gesetzt. Dadurch konnte die unkorrigierte Substanzkonzentration der jeweiligen Probe bestimmt werden.

Aus der zugesetzten Menge inneren Standards und der gefundenen Menge inneren Standards wurde dessen Wiederfindungsrate in Prozent bestimmt.

Der Quotient Q (s.o.) ist innerhalb eines Probenmaterials bei den in diesen Versuchen benutzten Konzentrationen weitgehend konstant und kann daher als Korrekturfaktor benutzt werden (KALIWODA, 1976).

In Vorversuchen mit Katzen konnte gezeigt werden, daß sich die Quotienten aus den Mäuseversuchen auch auf die Probematerialien der Katze anwenden lassen.

Für Q (s.o.) wurden probespezifisch folgende Werte ermittelt:

Serum: 1,2

Liquor cerebrospinalis: 1,25

Fruchtwasser: 0

Leber u. Niere: 1,3

Gehirn: 1,6

Die in 3.4 verwendete Menge Oktanol war aus versuchstechnischen Gründen nicht immer gleich groß, weil bei hoher Substanzkonzentration der Probe nur Teilvolumina der Oktanolphase zur weiteren Bestimmung entnommen wurden, um im linearen Meßbereich der Methode zu bleiben.

Am Ende der Probenaufarbeitung liegt die gesamte Diamidinmenge in einer wässrigen HCl-Phase vor.

Formelmäßige Berechnung der Substanzkonzentration
von 102/198 in flüssigen Proben:

$$\mu\text{g/ml} = \frac{K \cdot 0,5}{WR_{IS} \cdot O_v} \cdot Q$$

in Organproben:

$$\mu\text{g/g} = \frac{K \cdot O_g}{O_v \cdot WR_{IS} \cdot 2 \cdot G} \cdot Q$$

O_g = gesamt eingesetzte Menge Oktanol (ml) in
Aufarbeitungsschritt B in 3.4

G = Gewicht der Probe (g)

Bei zu erwartender Substanzkonzentration von
102/198 von 1 $\mu\text{g/ml}$ und darüber in Serum- L.c.-
oder Fruchtwasserproben konnten die Proben direkt
auf die Dünnschichtplatten aufgetragen werden.
Danach konnte chromatographiert, entwickelt und
gemessen werden. Die so erhaltenen Ergebnisse
mußten nicht über o.g. Formeln korrigiert werden.

3.8 Präzision und Richtigkeit

Für die Reproduzierbarkeit der gesamten Nachweismethode gilt (KALIWODA, 1976): Die relative Standardabweichung (S_{rel}) beträgt konzentrationsabhängig zwischen 1,9 und 2,8 %. Damit ist die Methode innerhalb des benutzten Meßbereiches mit der Reproduzierbarkeit anderer in-situ Fluoreszenzmessungen vergleichbar (MÜNCH, 1972 und PATAKI, 1968).

Um die Analysenmethode zu kontrollieren und um systematische Fehler zu vermeiden, wurden bei einigen Aufarbeitungen Richtigkeitskontrollen nebenher aufgearbeitet. Die Abweichung vom Sollwert lag stets innerhalb des dreifachen Variationskoeffizienten.

Bei der Beurteilung der Richtigkeit der Analysen wurde eine maximale Fehlerbreite von ± 20 % gemessen; diese Fehlerbreite ergab sich bei der Aufarbeitung von Faeces, wo der Variationskoeffizient mit 7,1 % am höchsten lag.

Beim direkten Auftragen von flüssigen Proben mit Konzentrationen von mehr als $1 \mu\text{g/ml}$ von 102/198 wurden Variationskoeffizienten bis 4,3 % gemessen, was auf die starke Benetzbarkeit der Pipettenspitzen mit Serum zurückzuführen ist.

In Vorversuchen galt es, die Methode so weit zu erlernen, daß mit denselben reproduzierbaren Ergebnissen zu rechnen war. Dies wurde zunächst mit frisch gewonnenem organischem Probematerial von Rindern aus dem Schlachthof durchgeführt.

Danach wurden die Eckwerte der Methodik mit Organproben und flüssigen Proben der Katze orientierend überprüft. Die Ergebnisse lagen innerhalb der in diesem Kapitel angegebenen Fehlerbreite und unterschieden sich auch hinsichtlich des Variationskoeffizienten nicht.

4. T i e r v e r s u c h

4.1 Applikation der Versuchssubstanz

Die Substanz 102/198 ist gut wasserlöslich und wurde mit aqua bidest. so verdünnt, daß dem Versuchstier eine Dosis von 10mg/kg Körpergewicht intravenös injiziert werden konnte. Das applizierte Volumen betrug ca 2ml. Gegenüber der i.m. Applikation kann bei der i.v. Applikation mit einer schnelleren Verteilung der Substanz gerechnet werden, was zu einem aussagekräftigerem Ergebnis hinsichtlich der Pharmakokinetik führt.

Die Substanz 102/198 ist atemdepressiv und hypoton wirksam (FINK, 1982), daher wurde zur Applikation ein Venenkatheter in die vena saphena eines Hinterlaufes gelegt. Damit war es möglich, die Substanz innerhalb von 5 Minuten langsam zu applizieren. Dazu wurde die Katze mit 35mg/kg Körpergewicht Pentobarbital (Nembutal ^(R)) i.p. narkotisiert. Beide Hinterläufe wurden rasiert, weil zur Entnahme der Blutproben die kontralaterale Seite des Applikationsortes gewählt wurde.

4.2 Probengewinnung

Liquor cerebrospinalis(L.c.)

Der L.c. wird bei der Katze am besten aus der Cisterna magna punktiert. Der Einstich erfolgt in der Mitte der Verbindungslinie zwischen den Praetuberantiae occipitales externae und dem Dornfortsatz des Axis in Richtung auf das Schädeldach. Dabei muß vor allem darauf geachtet werden, daß einerseits die Cisterna nicht durchstoßen und die dahinterliegende Medulla oblongata verletzt wird und andererseits bei der Aspiration des Liquors keinesfalls Blut mit angesaugt wird. Dessen Diamidingehalt würde den Aussagewert der Untersuchung stark beeinträchtigen. Nach medianer Durchtrennung der Haut wurde die Nackenmuskulatur im Subokzipitalbereich freipräpariert, so daß über dem hinteren Atlasbogen die Dura zu erkennen war. Mit einer Kanüle Nr. 12 wurde der Einstich in Richtung auf das Schädeldach in die Cisterna magna gesetzt und 1 bis max. 2ml L.c. abpunktiert.

Serum

Die Gewinnung des Blutserums wurde gleichfalls mit einem Venenkatheter, der in die kontralaterale Seite

des Applikationsortes gelegt wurde, vorgenommen. Mit dieser Technik konnte im Verlauf des Versuches aus der vena saphena mehrmals Blut abgenommen werden. Nach dem sofortigen Zentrifugieren (5000 U/min) wurde das Serum mit einer Eppendorfpipette abgetrennt und bis zur Aufarbeitung in verschlossenem Zustand bei 4°C in Polypropylengefäßen aufbewahrt.

Organe

Organe wurden nur drei verschiedenen Katzen entnommen, um Vergleiche zwischen Liquor-, Serum- und Organkonzentrationen zu erhalten.

Die Tiere wurden durch eine Überdosis von Pentobarbital (Nembutal (R)) ad exitum gebracht, dann wurden ihnen Herz, Leber und Nieren entnommen.

Zur Entnahme des Gehirns mußte die Schädeldecke von den Augenhöhlen bis zu den Ohren eröffnet werden.

Die Organe wurden mit Filterpapier getrocknet, gewogen und bis zur Aufarbeitung in verschlossenem Zustand bei -8°C in Polypropylengefäßen eingefroren.

4.3 Entnahmezeiten der verschiedenen Probematerialien

Tabelle 1

Nr. der Katze	Entnahmezeiten post applicationem(i.v.) von				
	L.c.	Serum	Gehirn	Organe*	Fruchtwasser
1	1 h	1 h			
2	2 h	1u.2h	2 h		
3	3 h	1u.2u.3h	3 h	3 h	3 h
4	5 h	1u.5h	5 h		
5	14 h	1u.4h 6u.14h			

* Organe: Leber, Niere, Herzmuskel

Da die Substanz 102/198 bei den narkotisierten Versuchstieren nach der Applikation teilweise zu starker Atemdepression führte, wurde bei einzelnen Tieren auf eine häufigere Entnahme von Proben verzichtet.

Die meisten Proben konnten daher nur jeweils einmal zu einer bestimmten Entnahmezeit gewonnen und auf ihren Diamidingehalt untersucht werden. Ausnahmen waren nur bei der Serumgewinnung möglich. Den größten Aussagewert hat daher der 1 Stunden - Serumwert mit einer fünfmaligen Bestimmung. Alle Proben wurden jedoch mindestens in zwei unabhängigen Ansätzen aufgearbeitet.

5. E r g e b n i s s e

5.1 Liquorspiegel

Tabelle 2

Konzentration von 102/198 im Liquor cerebrospinalis nach intravenöser Applikation von 10 mg/kg Körpergewicht.

Nr. der Katze	Entnahmezeit p. applicationem	Konzentration im Liquor cerebrosp.
1	1 h	ca 15 ng/ml
2	2 h	20 ng/ml
3	3 h	25 ng/ml
4	5 h	30 ng/ml
5	14 h	ca 17,5 ng/ml

5.2 Serumspiegel

Tabelle 3

Konzentration von 102/198 im Serum nach intravenöser Applikation von 10mg/kg Körpergewicht.

Nr. der Katze	Entnahmezeit p. applicationem	Konzentration im Serum
1 bis 5	1 h	700 ng/ml
1 + 2	2 h	250 ng/ml
3	3 h	250 ng/ml
5	4 h	170 ng/ml
4	5 h	130 ng/ml
5	6 h	105 ng/ml
5	14 h	50 ng/ml

5.3 Konzentration im Gehirn

Tabelle 4

Konzentration von 102/198 im Gehirn nach intra-
venöser Applikation von 10 mg/kg Körpergewicht.

Nr. der Katze	Entnahmezeit p. applicationem	Gehirnkonz. von 102/198 "gefäßreich" "gefäßarm"
2	2 h	- 500ng/g
3	3 h	1200 ng/g -
4	5 h	- 700ng/g

5.4 Konzentration in Leber, Niere und Herzmuskel

Tabelle 5

Konzentration von 102/198 in Leber, Niere und Herzmuskel nach intravenöser Applikation von 10 mg/kg Körpergewicht.

Nr. der Katze	Entnahmezeit p. applicationem	Konz. von 102/198 ($\mu\text{g/g}$)		
		Leber	Niere	Herz
3	3 h	46	52	2,2

5.5 Fruchtwasserspiegel

Tabelle 6

Konzentration von 102/198 im Fruchtwasser nach intravenöser Applikation von 10 mg/kg Körpergewicht.

Nr. der Katze	Entnahmezeit p. applicationem	Konzentration im Fruchtwasser ($\mu\text{g/ml}$)
3	3 h	0,5

6. D i s k u s s i o n

Die in dieser Arbeit angestellten Versuche mit Katzen zur Liquorgängigkeit der Substanz 102/198 müssen wegen der geringen Zahl von Versuchstieren als orientierend betrachtet werden, lassen sich jedoch gut mit den Versuchen an Mäusen (KALIWODA, 1976) vergleichen. Beide Experimente wurden mit derselben, sehr empfindlichen und gut reproduzierbaren Analysenmethode durchgeführt.

Im Mittelpunkt des Interesses dieser Arbeit standen die Liquorspiegel nach intravenöser Applikation der Substanz 102/198. Die gefundenen Substanzkonzentrationen im L.c. lassen sich dahingehend interpretieren, daß die Substanz in sehr geringen Mengen die Blut -Liquor- Schranke zu überwinden vermag.

Nach einer Stunde finden sich ca 15 ng/ml, eine Konzentration, die sich eben noch nachweisen läßt. Bis zur fünften Stunde steigt die Konzentration auf den doppelten Wert und fällt bis zur vierzehnten Stunde größenordnungsmäßig ungefähr auf den Einstundenwert ab.

Dabei ist interessant, daß sich die Substanz 102/198 anscheinend zunächst über einige Stunden

hinweg im L. c. anreichert, bevor die Konzentration wieder abnimmt. Dagegen beginnt die Elimination der Substanz aus dem Serum bereits mit dem Einstundenwert.

Zu jeweils gleichen Zeiten wurde die Konzentration von 102/198 im Serum zunächst ca 46 mal höher als im L.c. gefunden, nach 14 Stunden nur noch ca 2,8 mal höher.

Ob die in diesen Versuchen bestimmten Substanzkonzentrationen von 102/198 im L.c. eine ausreichende trypanozide Wirkung im zweiten Stadium der Trypanosomiasen entfalten können, muß in weiteren Versuchen geklärt werden.

In vitro Versuche mit Trypanosomen verschiedener Stämme in Gewebekulturen ergaben (BOROWY,1980), daß eine ausreichende, trypanozide Wirkung von 102/198 erst ab Konzentrationen von 0,1 µg/ml zu erwarten ist.

Weiter muß untersucht werden, ob sich die Durchlässigkeit der Blut - Liquor - Schranke bei infizierten Tieren verändert.

Wegen der toxischen Nebenwirkungen der Substanz 102/198 (SCHMIDT,KADUK u.FINK,1977 u.1978)u.(SCHMIDT, 1982) sowohl lokal am Applikationsort als auch systemisch auf verschiedene Organe, ist an eine wei-

tere Erhöhung der Dosis über 10 mg/kg Körpergewicht nicht zu denken.

Die Behandlungserfolge eines strukturverwandten Diamidins an Menschen und Affen müssen wegen der sehr kurzen Beobachtungszeit nach der Therapie zurückhaltend interpretiert werden (OGADA u. FINK, 1973) und (RAETHER u. SEIDÉNATH, 1972) In Versuchen an zwei infizierten Affen. (KALBHEN, 1980) konnte weder nach zwei Stunden noch vierundzwanzig Stunden nach der Applikation von $^{14}\text{-C}$ markiertem 102/198 Radioaktivität in entnommenen Liquorproben nachgewiesen werden. Demnach läge bei infizierten Affen das Verhältnis der Substanzkonzentrationen in Liquor und Serum unter 1 : 100 000.

Bei der Untersuchung eines Katzenshirns konnte gezeigt werden, daß kleine Mengen der Versuchssubstanz in dieses Gewebe gelangen. Dabei fand sich in den gefäßreichen Rindenbezirken ungefähr die doppelte Konzentration wie in den gefäßärmeren Markanteilen. Diese Beobachtung deckt sich mit fluoreszenzoptischen Untersuchungen an Mäusegehirnen (SCHUHMACHER, 1979) und Katzenshirnen (WAGNER, 1981), demzufolge sich die Substanz 102/198 beim Übertritt vom Blut in die

Liquorräume hauptsächlich in den Gefäßwänden der Hirnhäute und den Plexusepithelien anreichert. In den Zellen der Meningen und den Gliazellen der äußeren und inneren Hirnoberflächen wurde eine schwache Substanz - Fluoreszenz gesehen, wohingegen die Nervenzellen nicht fluoreszierten. Die Versuchssubstanz gelangt vermutlich durch das Plexusepithel in den Liquor und erreicht von dort aus die obersten Gliazellen durch Diffusion (SCHUEMACHER, 1980).

In einer Gegenüberstellung der Serumspiegel von 102/198 bei Katze, Maus und Kalb läßt sich ein ähnliches Eliminationsverhalten feststellen, wobei die Werte der Katze zwischen denen von Maus und Kalb liegen. Alle drei Serum - Eliminationskurven zeigen den Charakter einfacher Exponentialfunktionen.

Tabelle 7

Serumspiegel von 102/198 bei der Katze nach
i.v. Applikation verglichen mit Serumspiegeln
bei Maus und Kalb nach i.p. bzw i.m. Applikation.

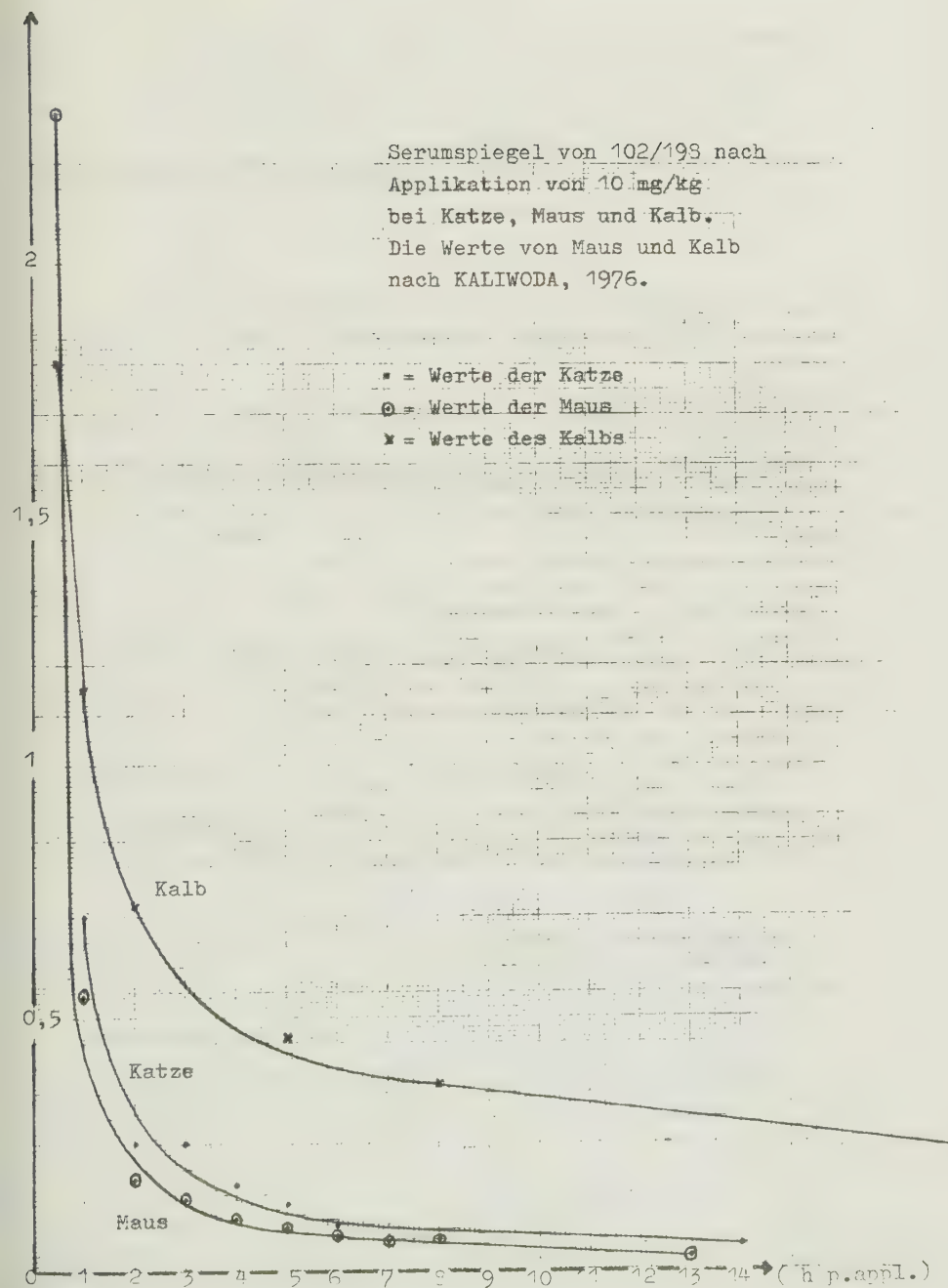
applizierte Substanzdosis 102/198 (mg/kg)	Zeit p. applicationem (h)	Serumspiegel in $\mu\text{g/ml}$		
		Katze	Maus	Kalb
10	0,25	-	5,2	-
	0,5	-	2,3	1,8
	1,0	0,7	0,54	1,15
	2,0	0,25	0,18	0,72
	3,0	0,25	0,14	-
	4,0	0,17	0,10	-
	5,0	0,13	0,085	0,46
	6,0	0,09	0,070	-
	7,0	-	0,054	-
	8,0	-	0,059	0,37
	13,0	-	0,025	-
	14,0	0,05	-	-
	24,0	-	-	0,17

Die Werte von Maus und Kalb entstammen der Arbeit von
KALIWODA, 1976.

K ($\mu\text{g/ml}$)

Serumspiegel von 102/193 nach
Applikation von 10 mg/kg
bei Katze, Maus und Kalb.
Die Werte von Maus und Kalb
nach KALIWODA, 1976.

- = Werte der Katze
- = Werte der Maus
- × = Werte des Kalbs



Bei der Aufarbeitung von Leber - und Nierengewebe wurden die höchsten Substanzkonzentrationen von 102/198 gefunden. Die Konzentration in der Niere lag drei Stunden nach der Applikation mit 52 $\mu\text{g/g}$ knapp über dem Leberspiegel mit 46 $\mu\text{g/g}$.

Im Herzmuskel wurden 2,2 $\mu\text{g/g}$ gefunden. Diese Konzentration scheint dafür auszureichen, eine Kardiomyopathie auszulösen (KADUK, SCHMIDT u. FINK, 1978).

Im Fruchtwasser einer trächtigen Katze war die Substanzkonzentration von 102/198 mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ nach drei Stunden ca doppelt so hoch wie im Serum des gleichen Tieres. Die Versuchssubstanz ist entsprechend diesem Einzelergebnis ziemlich sicher in der Lage, die Placenta - Schranke zu passieren.

Die für diese Versuche benutzte Methode muß als sehr arbeits- und zeitintensiv bezeichnet werden. Der Zeitaufwand von der Abnahme der Probe bis zum Analysenergebnis nach der Messung liegt bei ca zwei Tagen. Da mit dieser Methode noch sehr kleine Substanzkonzentrationen von 102/198 gemessen werden können, muß beim Umgang mit der fluoreszierenden Substanz auf sorgfältigste Arbeitsweise Wert gelegt

werden, um eine Kontamination zu vermeiden.
Ergebnisse im unteren Konzentrationsbereich, die
knapp über der Nachweisgrenze lagen, wurden mit
einem "ca" versehen.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die Liquorgängigkeit trypanocider Diamidine, deren therapeutische Wirkung zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch unzureichend ist, wird am Beispiel des fluoreszierenden Diamidins DAPI = 6-Amidino-2-(4-amidinophenyl)indol an Katzen untersucht (O. DANN u. Mitarbeiter).

Dazu wird mit einem Venenverweilkatheder eine Lösung der Versuchssubstanz DAPI intravenös appliziert.

Zu verschiedenen Zeiten post applicationem erfolgt die Probengewinnung von Liquor cerebrospinalis, Serum, Fruchtwasser und Organproben.

Die Aufarbeitung der Proben und die Messung der Diamidinkonzentrationen mittels in-situ-Fluorimetrie erfolgt nach einer von Kaliwoda entwickelten Methode (KALIWODA, 1976).

Im Liquor liegt die Konzentration deutlich unter den vergleichbaren Serumwerten, jedoch noch über der Nachweisgrenze der Methode. Eine Stunde p. appl. finden sich 15 ng/ml, bis zur fünften Stunde steigt

die Konzentration auf den doppelten Wert und fällt bis zur vierzehnten Stunde auf 17,5 ng/ml ab.

Der Übertritt des Diamidins DAPI durch die Blut-Liquor-Schranke ist demzufolge in sehr geringem Ausmaß möglich. Eine ausreichende trypanocide Wirkung im zweiten Stadium der Trypanosomiasen muß bei den im Liquor gefundenen Substanzkonzentrationen bezweifelt werden (BOROWY, 1982).

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- BOROWY, N.K.: Studies on the activity of trypanocidal diamidine DAPI in comparison with five standard trypanocides on T.b.brucei in culture, with special emphasis on the development of in-vitro technics for drug screening. Dissertation Erlangen, 1982
- BRAUNSBURG, H. und S.B. OSBORN :
Some general aspects of fluometric determinations.
Anal. Chim. Acta 6, 84 (1952)
- DANN, O., G. BERGEN, E. DEMANT, G. VOLZ :
Trypanocide Diamidine des 2-Phenylbenzofurans, 2-Phenyl-indens und 2-Phenyl-indols.
Justus Liebigs Ann. Chem. 749, 68-89 (1971)
- DANN, O., R. FERNBACH, W. PFEIFER, E. DEMANT, G. BERGEN, S. LANG, G. LÜRDING :
Trypanocide Diamidine mit drei Ringen in zwei isolierten Ringsystemen.
Justus Liebigs Ann. Chem. 760, 37-87 (1972)

DANN, O., H. FICK, B. PIETZNER, E. WALKENHORST,
R. FERNBACH, D. ZEH :
Trypanocide Diamidine mit drei isolierten
Ringsystemen.

Justus Liebigs Ann. Chem. 1975, 160-194

DANN, O., E. HIEKE, H. HAHN, H.-H. MISERRE, G. LÜRDING, R. RÖSSLER :
Trypanocide Diamidine des 2-Phenyl-thionaphthens.

Justus Liebigs Ann. Chem. 743, 23-45

(1970)

FINK, E. und O. DANN :

in Actes du colloque: Les Moyens de
lutte contre les Trypanosomes et leurs
Vecteurs, 297, Institut d'Elevage et de
Medecine veterinaire des Pays Tropi-
caux, Paris 1974

FINK, E. : Privatmitteilung, 1980

KADUK, B., H. SCHMIDT u. E. FINK :

Myocardial and vascular lesions due the
trypanocide DAPI. Abstract, XIIth Congress
of the international Academy of Path-
ology. Jerusalem, 1978

KALBHEN, D. A.:

Privatmitteilung, 1980

- KALIWODA, G.: Verteilung und Ausscheidung der trypanociden Diamidine 6-Amidino-2-(4-amidinophenyl)indol bei Maus und Rind sowie 6-Amidino-2-(4-amidinophenyl)-thionaphten und 5-Amidino-2-(4-amidinophenyl)benzofuran bei der Maus.
Dissertation Erlangen, 1976
- KNÜTTGEN, H.J.: Schlafkrankheit. In Nauck, E.G.: Lehrbuch der Tropenkrankheiten, 162-180. Stuttgart, 1975
- LOSOS, G.J. and B. O. IKEDE :
Review of Pathology of Diseases in Domestic and Laboratory Animals caused by Trypanosoma congolense, vivax, brucei, rhodesiense and gambiense. Veterinary Pathology. Suppl. ad Vol 9, 1972. S. Karger, Basel.
- MÜNCH, U. : Fluorometrische Bestimmungen von malariewirksamen 6-Amino-chinolinen nach dünnsschichtchromatographischer Trennung. Dissertation Erlangen, 1972
- NAUCK, E. G. : Lehrbuch der Tropenkrankheiten, 162-180, Stuttgart, 1975

OGADA, T., E. FINK u. D. MBWABI :

Clinical trials of diamidine 98/202
in Rhodesian sleeping sickness.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 67,
280, (1973)

PATAKI, G. : Some recent advances in thin-layer
chromatography. II. application of
direct spectrophotometrie and direct
fluometrie in amino acid, peptide and
nucleid acid chemistry.
Chromatographia 1, 492 (1968)

RAETHER, W. und H. SEIDENATH :

Die Wirkung von Berenil und 98/202 in
chronisch mit T. rhodesiense infi-
zierten Bärenmakaken.
Tropenmed. Parasitol. 27,238 (1976)

SCHMIDT, H., B. KADUK und E. FINK :

Morphologie der Nebenwirkungen try-
panocider Diamidine. 26.Tagung Europ.
Ges. Veterinärpathologie, Erlangen 1977
Abstract : Berl.-Münchn. Tierärztliche
Wsch. 90, 406, 1977.

SCHMIDT, H.: Histologische Veränderungen an Leber
Niere und Gehirn nach Applikation von
trypanociden Diamidinen.
Symp. Erlangen : Trypanocide, fluoreszie-
rende Diamidine, 1982

SCHUHMACHER, F. A. W. :

Zur organspezifischen Verteilung
und gewebspezifischen Lokalisation
von DAPI, 6-Amidino-2-(4-amidinophe-
nyl)indol in der Maus.

Dissertation Erlangen, 1979

SEILER, N. und H. MÖLLER :

Quantitative procedures in thin layer
chromatography, part 3.

Chromatographia 2, 470, 1969

WAGNER, J. : Verteilung von 6-Amidino-2-(4-amidino-
phenyl)indol im Katzensgehirn nach
intraventrikulärer Applikation.

Dissertation Erlangen, 1981

Aufrichtiger Dank gilt meinem Doktorvater , Herrn
Professor Dr. H. Schmidt , für die Erteilung und
Förderung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. O. Dann danke ich für die freund-
liche Aufnahme im Institut für Pharmazie und Lebens-
mittelchemie , ebenfalls Herrn Privatdozent Dr.Dr.
E. Fink und Herrn Dr. Harbaum-Neuhaus für die Unter-
stützung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 26.01.1955 wurde ich, Thomas Hohenstatt, als zweiter Sohn der Eheleute Otto und Gertrud Hohenstatt in Stuttgart geboren.

Aufgewachsen bin ich in Heilbronn a/N, wo ich von 1962 bis 1966 die Grundschule besuchte und anschließend das naturwissenschaftliche "Robert-Mayer-Gymnasium". Im Jahre 1974 legte ich dort die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1975 begann ich mit dem Medizinstudium in Erlangen und bestand das Staatsexamen im Oktober 1981.

Verheiratet bin ich seit dem 30.04.1981 .

Nach der Erteilung der Approbation am 22.10.1981 arbeitete ich als Stabsarzt im Bundeswehrkrankenhaus Amberg bis zum 1.11.1982.

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197